(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 10 월 24 일 (24.10.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/219882 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01) *A61K 35/30* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01) *A61P 25/14* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2024/005314

(22) 국제출원일: 2024 년 4 월 19 일 (19.04.2024)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2023-0051486 2023 년 4 월 19 일 (19.04.2023) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: **홍성희 (HONG, Sunghoi)**; 04974 서울특별시 광진구 아차산로70길 62, 305동 1401호., Seoul (KR). **남궁용 (NAM-KUNG, Yong)**; 02843 서울특별시 성북구 고려대로13길 18-23, 101호., Seoul (KR). **현동훈 (HYUN, Donghun)**; 02843 서울특별시 성북구 고려대로17가길 49-7, 401호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 파도특허법인 유한회사 (**PADO IP LAW PLLC**); 06194 서울특별시 강남구 테헤란로78길 16, 9층, Seoul (KR).

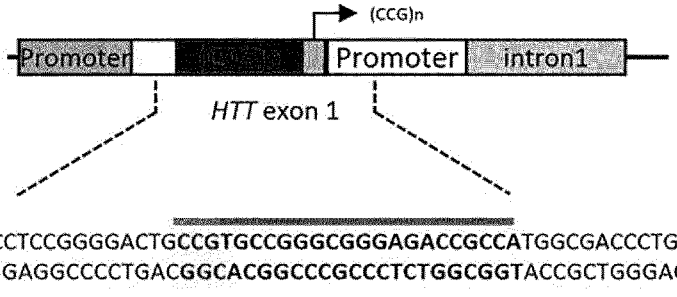
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** GENE-EDITED INDUCED NEURAL STEM CELLS USING HUNTINGTIN GENE-SPECIFIC GUIDE RNA, AND CELL THERAPEUTIC AGENT USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 헌팅틴 유전자-특이 가이드 RNA를 이용한 유전자 교정 유도신경줄기세포 및 이를 이용한 세포 치료제



(57) **Abstract:** The present invention relates to: a gene editing composition comprising a guide RNA for editing mutated CAG repeat sequences of neural stem cells (ciNSCs) induced from somatic cells of a Huntington's disease patient; the edited ciNSCs; and a cell therapeutic agent for Huntington's disease, comprising same, wherein, in the edited ciNSCs, Huntington gene mutations are removed by the guide RNA of the present invention, and thus treatment for Huntington's disease and neuronal proliferation can be improved.

(57) **요약서:** 본 발명은 헌팅턴병 환자 체세포로부터 유도된 신경줄기세포(ciNSC)의 돌연변이된 CAG 반복 서열을 교정하기 위한 가이드 RNA를 포함하는 유전자 교정용 조성물, 상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC) 및 이를 포함하는 헌팅턴병 세포 치료제에 관한 것으로, 상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)는 본 발명의 가이드 RNA에 의해 헌팅틴 유전자 돌연변이가 제거되어, 헌팅턴병에 대한 치료 및 신경세포 증식을 향상시킬 수 있다.

WO 2024/219882 A1

발명의 설명

발명의 명칭: 헌팅틴 유전자-특이 가이드 RNA를 이용한 유전자 교정 유도신경줄기세포 및 이를 이용한 세포 치료제

기술분야

[1] 본 발명은 헌팅턴병 환자 체세포로부터 유도된 신경줄기세포(ciNSC)의 돌연변이된 CAG 반복 서열을 교정하기 위한 가이드 RNA를 포함하는 유전자 교정용 조성물, 상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC) 및 이를 포함하는 헌팅턴병 세포 치료제에 관한 것이다.

배경기술

[2] 헌팅턴병은 유전 질환으로써, 4번 염색체에 존재하는 헌팅틴(HTT) 유전자의 돌연변이로 인한 과도하게 증가된 CAG repeat에 의해 발병되는 유전성 뇌신경 퇴행성 질환이다. 보통 성인기에 발병하는 헌팅턴 병의 일반적인 증상으로는 불수의적 움직임, 비정상적인 걸음걸이, 늘어지는 말투, 음식물을 제대로 삼킬 수 없는 연하 곤란, 인지 장애, 성격 장애 등이 있다.

[3] 유전자 교정 기술은 CRISPR Cas9 이전부터 연구되어 온 기술이다. 1세대 유전자 교정기술은 징크 핑거(zinc finger) 기술로써 아연 이온에 의해 구조적으로 안정화되는 DNA결합 도메인과 DNA절단 도메인으로 구성되어, 단백질의 특정 염기서열을 인지하면서 특정 위치를 절단해 버린다.

[4] 하지만 징크 핑거 기술은 정확도가 낮고 비용이 비싸다는 단점을 가진다. 2세대 유전자 교정 기술은 TALEN으로 징크 핑거 기술의 DNA결합 도메인 부분을 ZFN대신에 TALE단백질로 대체하여 개발한 기술이다. 상기 단백질은 식물 병원 세균 잔토모나스(Xanthomonas)에서 발견되었으며, 단백질 1개가 1개의 염기를 인식하기 때문에 1세대에 비해 더 정교해졌으나, 크기가 커서 세포 내로 주입하기 어려운 점, 결합 부위가 T 염기로 시작되어야 한다는 점, 메틸화 C에서는 작동을 못한다는 단점을 가지고 있다.

[5] 3세대 유전자 교정기술인 CRISPR Cas9 기술은 박테리아와 고세균과 같은 원생 생물의 유기체의 유전자에 발견된 DNA 서열이고, Cas9은 CRISPR서열에 상보적인 DNA의 특정 가닥을 인식하고 절단하는 효소이다. CRISPR Cas9은 RNA로 만들어진 가이드 RNA와 DNA 전달하는 효소인 Cas9으로 구성되어 있으며, 모든 세포에 적용이 가능하다. CRISPR Cas9 기술은 Cas9이라는 특정한 염기 서열을 인식하여 유전자를 자를 수 있는 효소가 그 염기서열을 포함하고 있는 single guide RNA (sgRNA)를 인식하여 특정한 DNA를 자를 수 있는 도구이다.

[6] sgRNA를 인식한 Cas9은 특정한 PAM에서 5'으로 3 염기쌍 떨어진 부분에 달라붙어 DNA의 이중나선의 절단을 일으키고, 이렇게 절단된 DNA는 크게 두 가지 기작으로 복구되는데, 상동성을 가지는 서열끼리의 재조합에 기반하는

HDR (상동성 기반 복구, homology di-rected repair)과 서열의 상동성과는 상관없이 두 말단을 연결해 버리는 NHEJ (비상동성 말단 결합, non-homologous end joining)로 나누어진다.

[7] 이러한 복구 기전들을 잘 이용함으로써 전략적으로 유전체 편집을 수행할 수 있으며, 이러한 유전체 편집에 가장 큰 영향을 주는 것 중 하나는 가이드 RNA의 서열이며, 이는 어떤 서열을 이용하느냐에 따라 유전자 교정의 효율을 결정할 수 있기 때문이다.

발명의 내용

기술적 과제

[8] 이에 본 발명자들은 돌연변이를 가진 헌팅턴병 환자 유래 직접교차분화 신경줄기세포에 적합한 가이드 RNA를 발굴 및 선정하고 CRISPR Cas9 기술을 이용해 교정하여 헌팅턴병에 대한 신경줄기세포 치료제를 완성하였다.

[9] 따라서, 본 발명의 목적은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 헌팅틴 유전자 교정용 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; Cas단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 돌연변이 헌팅틴 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)에 형질 도입하는 단계를 포함하는 헌팅틴 유전자의 교정 방법을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)를 포함하는 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 헌팅틴 유전자 교정용 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명의 일 측면에서, 상기 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)은 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것이다.

[14] 본 발명의 일 측면에서 상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 5'-Nx-NGG-3’ 또는 5’-PAM(CCN)-Nx-3’의 서열을 포함하는 것으로, 상기 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, Nx에서 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, x는 20 이내의 숫자이다.

[15] 본 발명의 일 측면에서, 상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것이다.

[16] 또한, 본 발명은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역 부위(UTR) 및 제 1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 돌연변이 헌팅틴 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD ciNSC)에 형질 도입하는 단계를 포함하는 헌팅틴 유전자의 교정 방법을 제공한다.

[17] 본 발명의 일 측면에서, 상기 돌연변이 헌팅틴 유전자는 상기 제1엑손에 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함한다.

[18] 본 발명의 일 측면에서 상기 유도신경줄기세포는 헌팅턴병 환자의 체세포로부터 직접 교차 분화 과정을 통해 유도된 것이다.

[19] 또한, 본 발명은 상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)를 포함하는 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[20] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[21] 일 측면에서 본 발명은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역 부위(UTR) 및 제 1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA(sgRNA), 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 헌팅틴 유전자 교정용 조성물에 대한 것이다.

[22] 상기 헌팅틴(HTT) 유전자 상염색체 4번에 위치하며, 67개의 엑손과 66개의 인트론을 포함하고 있다. 헌팅턴병은 상기 헌팅틴 유전자의 제1엑손 부분에 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하며, 비정상적인 헌팅틴 단백질의 발현이 증가되면서 발병한다. 본 발명에서 상기 조성물은 상기 헌팅틴 유전자의 제 1엑손에 포함된 비정상적인 CAG 반복 서열을 교정하기 위한 것으로, 상기 서열을 타겟으로 하는 sgRNA를 포함한다.

[23] 본 명세서에서 용어 '가이드 RNA(guide RNA)'는, 표적 DNA에 특이적인 RNA로, Cas 단백질과 복합체를 형성하여, 상기 Cas 단백질을 표적 DNA로 가져오는 역할을 한다.

[24] 본 발명의 상기 가이드 RNA는 sgRNA(single-guide RNA))일 수 있으며, 상기 sgRNA는 RNA의 형태 또는 sgRNA를 암호화하는 DNA의 형태로 세포 또는 유기체에 전달될 수 있다. sgRNA는 분리된 RNA의 형태, 바이러스 벡터에 포함되어 있는 RNA, 또는 벡터에 암호화되어 있는 형태일 수도 있다. 바람직하게, 상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 플라스미드일 수 있으며, 그 종류에 제한되는 것은 아니다.

[25] 상기 가이드 RNA는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역부위(UTR) 및 제1엑손에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 가이드 RNA가 타겟 하는 뉴클레오티드 서열은 5'-Nx-NGG-3' 또는 5'-PAM(CCN)-Nx-3'의 서열을 포함하는 것으로, 상기 N은 각각 A, G, C

및 T 중 임의의 하나이고, Nx에서 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, x는 20 이내의 숫자이다. 보다 구체적으로, 상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열(RG1)을 포함하는 것일 수 있고, 서열번호 2의 뉴틀레오티드 서열은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역부위(UTR) 및 제1엑손에 동시에 위치하며, 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 것이다.

[26] 본 명세서에서 용어 'Cas 단백질'은 "Cas 단백질"은 CRISPR/Cas 시스템에서 필수적인 단백질 요소를 의미하고, CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)로 불리는 두 RNA와 복합체를 형성할 때, 활성 엔도뉴클레아제 또는 니카아제 (nickase)를 형성하며, 이중가닥 DNA를 분해하는 역할을 한다. 상기 Cas 단백질은 바람직하게는 Cas9 단백질일 수 있다.

[27] 다른 측면에서 본 발명은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 돌연변이 헌팅틴 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)에 형질 도입하는 단계를 포함하는 헌팅틴 유전자의 교정 방법에 대한 것이다.

[28] 본 명세서에서 "신경줄기세포"는 자기복제능력을 가지고 있으며 뉴론 (neuron) 및/또는 글리아(glia), 예를 들면, 성상세포(astrocyte), 희돌기교세포 (oligodendrocyte) 및/또는 슈반세포(Schwann cell) 등으로 분화하는 다분화 능력을 가진 미분화세포이다. 신경 줄기세포는 특정한 신경계 세포를 만들어내는 신경전구세포나 글리아 전구세포의 단계를 거쳐서 신경세포(neural cell), 예를 들면 뉴런이나 글리아로 분화하게 된다.

[29] 본 발명에서 상기 '유도신경줄기세포(ciNSC)'는 헌팅턴병 환자의 체세포를 '직접교차분화'하여 제조한 것일 수 있다. 상기 '직접교차분화'는 세포 리프로그래밍 기술 중 하나로, 이미 성숙한 분화 세포를 직접 리프로그래밍하여 줄기세포로 되돌리는 기술로서, 다양한 방법을 통해 외부 유전자를 도입할 수 있으며, 그 방법에 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 소분자 화합물을 이용하여 직접 전환을 유도할 수 있다.

[30] 상기 '직접교차분화'는 그 방법에 제한되는 것은 아니나, 티아조비빈 (Thiazovivin), 발프로익산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, DZNep(Deazaneplanocin A), 5-AZA 및 CHIR99021 중 하나 이상의 소분자 화합물을 조합하여 포함하는 배지에서 인간 섬유아세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있고, 상기 배지에 센다이바이러스, mRNA 또는 miRNA 중 하나 이상을 추가로 포함하여 배양할 수 있다.

[31] 또한, 상기 '돌연변이 헌팅틴 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD ciNSC)'는 헌팅턴 환자의 체세포로부터 유래되어 헌팅틴 유전자의 제1엑손에 비정상적인 CAG 반복서열을 포함하는 것으로, 본 발명의 일 실시예에서 상기 헌팅턴병 환자 세포로부터 유래된 유도신경줄기세포는 '교정 전 HD ciNSC'라고

하였다. 본 발명에서 상기 교정 전 HD ciNSC는 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 형질 도입하여 교정할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 이를 교정 ciNSC라고 하였다.

[32] 본 명세서에서 상기 '형질도입'은 그 방법에 제한되는 것은 아니며, 미세주입법 (microinjection), 전기천공법 (electroporation), DEAE-덱스트란 처리 (DEAE-dextran treatment), 리포펙션 (lipofection), 나노파티클-매개 형질주입, 단백질 전달 도메인 매개 도입, 바이러스 또는 비바이러스 매개 유전자 전달체 및 엑소좀 등과 같은 당업계에 공지된 다양항 방법에 따라 전달될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 전기천공법을 이용하여 플라스미드 DNA를 형질 도입하였다.

[33] 또한 GABAergic 신경세포는 뇌내에서 GABA를 분비하며, GABA(γ-aminobutyric acid)는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산으로 포유동물의 뇌나 척수에 존재하는 신경 전달 물질로 알려져 있으며, 헌팅턴병 환자에게서 손실되는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 상기 교정 전 유도신경줄기세포(HD ciNSC)는 교정을 통해 실제 헌팅턴병 환자에게서 손실된 GABA성 신경 세포로 분화 유도 시, 훨씬 높은 분화 효율을 보였다.

[34] 본 발명의 일 실시예에서, 돌연변이 헌팅틴 유전자를 포함하는 환자의 체세포에 대하여, 이를 먼저 유도 신경줄기세포로 직접교차분화하고, 상기 유도 신경줄기세포에 Cas9 단백질을 암호화하기 위한 pRGEN_Cas9_CMV 및 돌연변이 HTT를 타겟하는 sgRNA를 암호화하는 pRGEN_Human_HTT 총 2가지 재조합 플라스미드로 형질 도입하였으며, 이 때, Cas9 단백질이 sgRNA의 매개 하에 타겟 서열 영역을 절단하여 DNA 이중-가닥 절단을 형성하고, 유기체의 자가-손상 복구 기전이 촉발되어, 일부 서열이 삽입되거나 삭제될 수도 있다. 본 발명의 경우, 자가-손상 복구 기전을 이용하여 비정상적인 CAG를 포함한 돌연변이 헌팅틴(HTT) 유전자의 발현을 차단하여, 돌연변이 HTT 단백질 합성을 차단한다.

[35]

[36] 본 발명의 또 다른 측면에서 본 발명은 상기 교정된 유도신경줄기세포 (ciNSC)를 포함하는 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대한 것이다.

[37] 본 명세서에서 용어 "예방"은 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 헌팅턴병에 대한 증상을 억제하거나, 발병을 지연시킬 수 있는 모든 행위를 의미한다.

[38] 본 명세서에서 용어 "치료"는 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[39] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 제형화에 필요한 담체

혹은 부형제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 유효 성분에 추가로 포함될 수 있는 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 포함된다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[40] 본 발명의 약학 조성물은 원하는 조직 부위로 직접 이식하거나 이동하는 방식으로 투여되어, 손상된 신경계가 재생되거나 기능적으로 회복되도록 한다. 예컨대, 본 발명의 신경줄기세포를 손상된 신경 부위로 직접 이식한다. 이식은 단세포 현탁액 또는 일정 세포 밀도의 집합체를 이용하여 수행할 수 있다.

[41] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

발명의 효과

[42] 본 발명은 CRISPR Cas9 시스템을 이용하여 헌팅팅(HTT) 유전자의 돌연변이를 교정하기 위한 유전자 교정용 조성물, 유전자의 교정 방법 및 이를 이용한 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대한 것으로, 소분자 화합물의 조합을 이용하여 체세포의 염색체 DNA에 유전자 삽입이 없는 대량 증식 가능한 직접 교차 분화 신경줄기세포를 제작하고, CRISPR Cas9 시스템을 이용해 헌팅턴병의 원인이 되는 HTT유전자의 과도한 CAG repeat을 정상 범위의 CAG repeat으로 유전자로 교정하여 헌팅턴병 세포치료제를 제작하는 것이다. 즉, 소분자 화합물을 이용한 직접교차분화를 통해, 유전자 삽입없는 안전한 고품질의 헌팅턴병 환자 체세포 유래 신경줄기세포를 유도할 수 있고, 유전자 교정을 통해 헌팅턴병의 원인을 제거한 신경줄기세포로써, 헌팅턴병 세포치료제로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[43] 도 1은 유전자 교정을 위한 후보 sgRNA 위치와 헌팅턴병 환자 체세포로부터 확보된 유도신경줄기세포를 이용한 유전자 교정 원리를 나타낸 것이다.

[44] 도 2는 유전자 교정된 유도신경줄기세포의 클론화 및 PCR 스크리닝까지의 과정을 나타낸 모식도이다.

[45] 도 3은 유전자 교정 후 T7E1 assay를 통해 교정된 유도신경줄기세포들을 선별하는 방법을 나타낸 도이다.

[46] 도 4는 상기 도 3의 과정을 통해 선별된 유도신경줄기세포의 클론을 이용하여, 유전자 교정 부위를 PCR로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[47] 도 5는 상기 도 4의 PCR 결과 돌연변이 CAG 반복 서열을 가진 돌연변이 HTT(mHTT) 발현을 웨스턴 블럿을 통해 확인한 결과이다.

[48] 도 6은 RGEN tool에서 확인한 3base pair miss match off target 후보군으로서, off target 후보군 3곳을 Band PCR과 전체 게놈 시퀀싱을 이용하여 타겟 위치에 대한 서열 변화(indel)을 확인한 결과이다.

[49] 도 7은 헌팅턴병 환자 체세포 유래 유전자 교정 전후의 신경줄기세포들을 헌팅턴병에서 손실이 일어난다고 알려진 GABA성 신경세포로 분화한 결과로서, 분화 여부를 면역 염색으로 확인한 것이다.

[50] 도 8은 도 7의 면역형광염색 을 통해 확인한 유전자 교정 전후의 GABA성 신경세포를 정략적으로 분석한 결과이다.

[51] 도 9는 Realtime PCR 기술을 통해 GABA성 신경세포 마커인 GAD65, GABRA1, GABRA2의 상대적 발현량을 확인한 결과이다.

[52] 도 10은 헌팅턴병 환자 유도 신경줄기세포와, 유전자 교정된 신경줄기세포간의 세포사멸 연관 유전자(caspase-3, p53, annexinV)의 발현량을 비교한 결과이다.

[53] 도 11은 헌팅턴병 환자 유도 신경줄기세포와, 유전자 교정된 신경줄기세포간의 세포 증식 속도를 비교한 결과이다.

[54] 도 12는 헌팅턴병 환자 유도 신경줄기세포와, 유전자 교정된 신경줄기세포간의 세포 사멸 및 증식 속도와 관련하여, 신경구체를 형성한 모습을 비교한 결과이다.

[55] 도 13은 헌팅턴병 환자 유도 신경줄기세포와, 유전자 교정된 신경줄기세포간의 세포사멸 연관 유전자(caspase-3)의 발현을 세포면역염색을 통해 비교한 결과이다.

[56] 도 14는 뇌내 독성주입(Quinolinic acid;QA)을 통해 만든 헌팅턴병 동물 모델을 이용하여, 유전자 교정된 신경줄기세포 투여에 따른 운동능력 회복을 확인하기 위한 실험 모식도이다.

[57] 도 15는 상기 도 14의 실험 결과 확인된 뇌내 독성주입(Quinolinic acid;QA)을 통해 만든 헌팅턴병 동물 모델에 대한 유전자 교정된 신경줄기세포 투여에 따른 운동능력 회복을 나타낸 것이다.

[58] 도 16은 헌팅턴병 형질전환 마우스인 R6/2 모델을 이용하여, 유전자 교정된 신경줄기세포 투여에 따른 운동능력 회복을 확인하기 위한 실험 모식도이다.

[59] 도 17은 도 16의 실험 결과 확인된 R6/2 모델을 이용하여, 유전자 교정된 신경줄기세포 투여에 따른 운동능력 회복 결과를 나타낸 것이다.

[60] 도 18은 헌팅턴병 형질전환 마우스인 R6/2 모델을 이용하여, 유전자 교정된 신경줄기세포 투여에 따른 생존률 및 체중 변화를 측정한 결과이다.

[61] 도 19는 헌팅턴병 형질전환 마우스인 R6/2 모델에 교정전 신경줄기세포 (HD ciNSC)와, 교정된 신경줄기세포(ciNSC)를 주입하여 유전자 교정 전과 후의 유효성을 검증하기 위하여, 운동 능력 회복 정도를 비교한 것이다.

[62] 도 20은 신경줄기세포 투여군에서 투여 부위 주변 뇌조직을 이용한 Immunohistochemistry를 수행한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[63] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세히 설명한다. 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지는 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[64]

[65] **<실시예 1> 인간의 HTT 유전자 CAG 교정을 위한 sgRNA 타겟 부위 선정**

[66] HTT 유전자는 상염색체 4번에 위치하며, 67개의 엑손과 66개의 인트론을 포함하고 있다. HTT 유전자에서 교정해야 할 비정상적인 CAG 반복 서열은 제 1엑손에 위치하며, 교정을 위해 선택된 sgRNA 타겟 부위들은 5‘비번역 부위와 제1 엑손에 위치한다(도 1).

[67] 인간 유전체에서 HTT 유전자의 5’비번역 부위, 보존된 영역을 포함하는 제 1 엑손의 뉴클레오티드 서열은 서열 번호 1과 같다. 서열 번호 1에서 1-315번 위치는 5‘비번역 부위이고, 316-615번 위치는 제1엑손의 위치이다.

[68] 본 발명에서 CRISPR/Cas9에 타겟이 될 이중 가닥 DNA 중 한 가닥은 다음의 구조를 가진다 : 5’ - Nx - NGG - 3’ 또는 5’ - PAM(CCN) - Nx - 3’ 에서 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, Nx에서 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, x 는 20. 구체적으로, 상기 타겟 서열은 하기의 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 이루어지며, 타겟(RG1)은 5‘비번역 부위와 제1 엑손에 동시에 위치한다.

[69] 서열번호 2 : RG1 : 5' - CCGTGCCGGGCGGGAGACCGCCA - 3'

[70]

[71] **<실시예 2> 체세포로부터 유도신경줄기세포(HD-ciNSC) 직접 교차분화**

[72] 돌연변이가 유발된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하는 체세포(섬유아세포)를 유도신경줄기세포(HD ciNSC)로 직접 교차분화하였다. 상기 섬유아세포는 헌팅턴병 환자로부터 수득하였다.

[73] 구체적으로, 섬유아세포 $1x10^5$개를 60mm dish에 준비하고, 리프로그래밍과 관련된 8종의 소분자 화합물(티아조바이빈(Thiazovivin), 발프로익 산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, CHIR99021, 5-Aza-2′-deoxycytidine 및 DZNep)을DMEM/F12, N2 supplement, B27 supplement, bFGF 및 EGF로 구성된 neurobasal medium에 첨가하여 준비된 세포를 배양하였다. 상기 8종 소분자 화합물 각각의 특성 및 분화 방법에 대해서는 선행 특허(등록 특허 제 10-1816103)에 기재된 바와 같다.

[74]

[75] **<실시예 3> 유도신경줄기세포에 대한 형질 도입**

[76] 상기 1-2에서 제조된 유도신경줄기세포(HD ciNSC)에 대하여, CRISPR/Cas9 방법을 통한 유전자 교정을 위한 형질 도입을 진행하였다.

[77] 먼저, Cas9 단백질을 발현하기 위하여 CMV 프로모터를 포함하는 재조합 플라스미드 pRGEN_Cas9_CMV(7383bp) 및 상기 1-1에서 선정한 타겟에 대한 sgRNA를 전사하는데 사용될 수 있는 재조합 플라스미드 pRGEN_Human_HTT(2488bp)를 각각 제작하였다. 상기 두 가지 재조합 플라스미드(pRGEN_Cas9_CMV, pRGEN_Human_HTT)는 각각 1ug, 500ng씩 2:1 비율로 하여 1.5ug/ul 농도로 ep-tube에 넣고 잘 섞일 수 있도록 파이펫팅하였다.

[78] 상기 1-2의 돌연변이 헌팅틴 유전자를 포함하고 있는 환자 유도신경줄기세포(HD ciNSC)는 배양액을 제거하고 PBS 3ml로 2번 세척하였다. HD-ciNSC에 StemPro Accutase™ Cell Dissociation Reagent(Gibco)를 1ml 넣어 세포를 떼어주고, 37℃, CO_2 배양기에서 3분간 반응시켰다. 반응 후, dish 옆면을 5~6회 tapping 하여, 세포가 떨어진 것이 확인되면, 2 ml의 ciNSC 배양액을 추가해주어, dish를 닦아준 후, 총 3ml을 15ml tube에 옮겨주었다. 옮겨진 15ml tube에서 세포를 계수하고, 1500 RPM에서 3분 동안 원심 분리하였다. 세포 pellet을 확인한 후, pellet에 유의하여, 상층액만을 제거하였다. 세포 pellet에 $4x10^5$ cells/10ul의 농도로 Resuspension Buffer R을 넣어주고, 파이펫팅을 통해 세포 pellet을 풀어준다. PLO/FN 코팅이 완료된 6 well plate에 pen/strep이 빠진 ciNSC 배양액을 각 well 당 2ml씩 분주하고, humidified 37℃/5% CO_2 incubator에서 배양액을 warming해주었다.

[79] 이후 준비한 재조합 플라스미드(pRGEN_Cas9_CMV, pRGEN_Human_HTT)와 세포 R 버퍼 부유물을 잘 섞어준 다음 제조사에서 제공하는 Neon electroporation system(Thermofisher scientific) 프로토콜에 따라 세포에 플라스미드를 전달하였다(1400V, 20ms, 1 time).

[80] 이후 배양된 세포를 같은 방법으로 떼어내 $1x10^3$개씩 100mm dish에 8일간 다시 배양한 후, 형성된 콜로니를 24 well plate에 배양하여 클론화 시켰다.

[81]

[82] **<실험예 1> PCR에 의한 HTT 유전자 교정 확인**

[83] 상기 실시예에 따라, 돌연변이 HTT 유전자 교정 효과를 확인하기 위하여, PCR을 진행하였으며, 실험 과정은 도 3과 같이 나타내었다. 상기 실시예에서 클론화된 세포를 6 well plate에 배양하여 confluency가 70-80%일 때 Accutase로 떼어내고, QIAamp DNA Mini Kit(QIAGEN)을 사용하여 genomic DNA를 확보하였다. 확보된 DNA는 PrimeSTAR® GXL DNA polymerase(TAKARA) 및 서열번호 3 및 4의 CAG repeat primer를 이용하여 PCR을 진행하였다. 상기 PCR은 조건은 (98℃-10s, 68℃-30s)으로 총 30cycle 진행하였고 1.6% 아가로스 겔에 전기 영동하여 PCR product 밴드를 확인하였다.

[84] [표1]

Forward primer	5'- TGC CGG GAC GGG TCC AAG ATG -3'	서열번호 3
Reverse primer	5'- TGG GTT GCT GGG TCA CTC TGT C -3'	서열번호 4

[85] 정상인의 경우 500-600bp의 밴드가 검출되고, 환자의 경우에는 CAG 반복 횟수에 따라 600-1000bp 사이의 밴드가 확인된다. 유전자 교정의 genotyping을 확인하기 위해 AccuCRISPR™ Mutation Detection Kit (Bioneer)를 업체에서 제공된 프로토콜에 따라 진행하여 분석했다. 그 결과 도 4에서 보듯이, #1 및 #3에서 최종적으로 돌연변이 CAG repeat(150회) band가 T7에 의해 잘리는 것을 확인하였다.

[86]

[87] **<실험예 2> 웨스턴 블롯에 의한 헌팅틴 단백질 발현 확인**

[88] 실시예 3에서 배양중인 클론화된 세포는 RIPA Lysis and Extraction Buffer(Thermofisher scientific)와 Pierce Protease inhibitor(Thermofisher scientific)를 사용하여 세포를 resuspension 시키고, 제조사의 프로토콜에 따라 단백질을 추출하였다.

[89] Bradford assay를 이용하여 단백질 농도를 측정하고, Pierce™ Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer(Thermofisher scientific)와 3차 증류수를 이용해 단백질의 최종농도는 2ug/ml로 준비하여 끓는 물에서 5분간 단백질을 변성시켰다. 이후 4%-15% TGX gels(Bio-rad)와 TGS (Tris-Glycine-SDS) running buffer (Bio-rad)를 이용해 단백질을 전기 영동 하였고, PVDF membranes (Bio-rad)에 transfer를 진행했다. 이후 PBS에 0.1% Tween 20, 5% 농도로 skim milk를 넣어 1시간 동안 상온에서 blocking하였다. 이후 1차 안티 바디(Total HTT, MAB2166)를 1:1000 농도로 하여 PBS에 0.1% Tween 20, 5% skim milk 용액에 섞어 4℃에서 16시간 incubation하고, 2차 안티 바디(Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody. 31430, Thermofisher scientific)는 1:10000 비율로 PBS에 0.1% Tween 20, 5% skim milk 용액에 섞어 상온에서 1시간동안 incubation 하고, ECL buffer(Bio-rad)를 이용해 돌연변이 헌팅틴 단백질 발현을 확인하였다.

[90] 그 결과 도 5에서 보듯이, 돌연변이 CAG repeat을 가진 mutant HTT(mHTT) 발현을 Western blot을 통해 확인하였으며, 최종적으로 #1 line에서 mHTT가 발현되지 않아 유전자 교정됨을 확인하였다.

[91]

[92] **<실험예 3> off-target effect 분석**

[93] **3-1. 전체 게놈 서열분석(Whole geneome sequencing)**

[94] 시퀀싱 라이브러리는 TruSeq PCRfree DNA High Throughput Library Prep Kit(Illumina)의 제조업체 지침에 따라 준비되었다. 간단히 말해서, 1ug의 게놈 DNA를 adaptive focused acoustic technology(Covaris)을 사용하여 절단 및 파편화하였다. 이후 파편화된 DNA는 5'-phosphorylated blunt-ended dsDNA를

생성하기 위해 말단을 복구하였다. 복구 후, DNA는 bead-based 방법으로 selection 하였다. 이 DNA 조각들은 단일 'A' 염기의 추가와 TruSeq DNA UD indexing adapters와 연결되었다.

[95] 정제된 라이브러리는 qPCR Quantification Protocol Guide(Illumina Sequencing Platforms for KAPA Library Quantification kit)에 따라 qPCR을 사용하여 정량하였으며, High-sensitivity DNA chip(Agilent Technologies)을 사용하여 정량하였다. 이후, NovaSeq(Illumina)을 이용하여 Paired end sequencing(2×150bp)을 Macrogen에서 수행하였다.

[96] **3-2. PCR을 이용한 off-target effect 확인**

[97] 본 발명에서 사용된 sgRNA는 RGEN tool을 통해 염색체 1번(chr1), 19번(chr19), 20번(chr20)에서 3bp의 mismatches가 확인되었으며, 이를 3base pair miss match off target 후보군으로 보고, 이에 대한 off-target effect를 PCR을 통해 검증했다. PCR을 진행하여 온전히 하나의 밴드가 형성될 경우 frame-shift가 일어나지 않은 것으로 판단했다.

[98] 실험에 사용한 primer서열은 하기 표에 나타냈다(서열번호 5 내지 서열번호 12). PCR은 Easytaq(Transgenbiotech)을 이용해 진행하였고, 1.6% 아가로스겔에 전기 영동하여 확인하였다. 그 결과 도면 6에서 보듯이, 선정된 sgRNA는 clone #4에서 세 곳의 off-target 후보군에 변화(indel)가 확인되지 않아 off-target effect가 없는 것을 확인하였다.

[99] [표2]

Chr1	off-target_Chr1_F	5' - CAG CAC AGA A CT GCA GAC AGC - 3'	서열번호 5
	off-target_Chr1_R	5' - AGA CCC AAG A CA CAG GAC AGC - 3'	서열번호 6
Chr19	Off-target_Chr19_F	5' - TAG ACG AGG T TG GGG CTG C - 3'	서열번호 7
	Off-target_Chr19_R	5' - ACG ACT CGT T CA CGC CTG C - 3'	서열번호 8
Chr20(1st PCR)	Off-target_Chr20_1st_F	5' - CCA ATG TCT G TC CAC AGC - 3'	서열번호 9
	Off-target_Chr20_1st_R	5' - TTC ACG CCA T TC TCC TGC - 3'	서열번호 10

Chr20(Nested PCR; 2nd PCR)	Off-target_Chr20_2nd_F	5' - TGG GAG TCT C AC TCT GTT GC - 3'	서열번호 11
	Off-target_Chr20_2nd_R	5' - CTG GGT TTC A CC GTG TTA GC - 3'	서열번호 12

[100] **<실험예 4> GABA성 신경 세포 분화 결과4-1. 면역 형광 염색**

[101] 헌팅턴병 환자 체세포 유래 유전자 교정 전후의 신경 줄기세포들을 GABA성 신경 세포로 분화를 진행하였다. 교정전 HD ciNSC 및 교정 ciNSC를 각각 poly-L-ornithine/fibronectin(PLO/FN)이 코팅된 24 well plate에 GABA 유도 배양액을 처리하기 하루 전에 $5x10^4$cell/well 로 seeding 해주었다. 0~7일 동안 DMEM F12 및 Neurobasal media 가 1:1인 배양액에, 0.5X N2 supplement, 0.5X B27 supplement, 1X MEM-NEAA, 100ug/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 10uM 발프로닉 산, 0.65uM 푸르모르파민, 2uM SB431542, 0.1uM 레티노익산, 1uM CHIR99021, 200nM 도르소모르핀, 100nM LDN193189, 200uM 아스코빅산을 포함하는 배양액에서 배양하였다.

[102] 이후, 7~35일 동안 DMEM F12, Neurobasal media가 1:1로 섞인 배양액에 0.5X N2 supplement, 0.5X B27 supplement, 1X MEM-NEAA, 100ug/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 200uM 아스코르빅산을 넣은 배양액으로 배양하면서 GABA 뉴런을 성숙시켜주었다. 배양 후 14일, 21일, 28일 및 35일에 뉴런 모양의 GABA 신경 세포를 세포 면역 염색을 통해 확인하였다.

[103] 그 결과, 도 7에서 보듯이, 교정 ciNSC는 교정 전 HD ciNSC보다 신경세포로의 분화율과 GABA성 신경세포로의 분화 효율이 모두 높아진 것을 확인하였다. 또한, mature 신경세포 마커인 MAP2는 28일까지 헌팅턴병 환자 세포에서는 확인되지 않았다. 상기의 결과를 도 8과 같이 정량적으로 확인하였다.

[104]

[105] **4-2. 유전자 마커 발현**

[106] 교정된 ciNSC를 GABA성 분화 뉴런으로 분화를 시작한지 14일, 21일, 28일에 Trizol (Thermo fisher)를 이용하여 각각의 RNA를 회수했다. 회수한 RNA는 RT-PCR을 진행하여 cDNA로 변환(conversion)했다. cDNA는 sybr green (KAPA)을 이용한 Realtime PCR 기술을 통해 GABA성 신경세포 마커인 GAD65, GABRA1, GABRA2의 상대적 발현량을 확인하였다. 그 결과 도 9와 같이, 분화가 진행되면서 GABA성 신경세포 마커 유전자들의 발현이 높아지는 것을 확인하였다. 또한, 농도에 따라 유전자 발현 억제 능력이 다르며 400pmol에서 안정적인 발현 억제가 이루어지는 것을 확인하였다.

[107]

[108] **<실험예 5> 세포 사멸 및 증식 속도 비교**

[109] **5-1. 유전자 교정에 의한 세포 사멸 감소**

[110] 신경줄기세포는 부착되지 못하면 서로 뭉치는 특성이 있다. 교정 전 유도신경줄기세포(HD ciNSC) 및 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)를 $1x10^6$ 개씩 100mm 페트리 디쉬에 4일간 배양하였다. 이후, 도 10과 같이, 상기 배양된 각각의 세포에서 세포 사멸 관련 유전자인 caspase-3, p53, annexinV의 발현이 모두 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[111] **5-2. 유전자 교정에 의한 세포 증식 속도 확인**

[112] PLO/FN 이 코팅된 60mm dish에 $1x10^5$개의 세포를 4일간 배양 후 세포 양을 측정하여 세포의 증식 속도를 측정하였다. 그 결과 도 11과 같이, 교정 전 HD ciNSC는 교정된 ciNSC보다 더블링 타임이 약 14시간 느린 것으로 확인되었다.

[113] 또한 상기 배양 결과 형성된 신경 구체를 광학 현미경을 통해 관찰한 결과, 교정 전 HD ciNSC는 증식 속도가 더디고 세포 사멸이 많아 신경 구체가 매끈하지 못하고 울퉁불퉁하였으나, 교정된 ciNSC는 매끈한 신경구체를 형성한 것을 확인할 수 있었다(도 12).

[114] **5-3. GABA성 신경세포 분화 시 세포사멸 유전자 발현 비교**

[115] 실험예 4에서 분화한 GABA성 신경세포에 대하여, 상기 5-1 및 5-2의 방법으로 세포 사멸 관련 유전자(caspase-3)의 발현을 확인하였다. 그 결과, 도 13과 같이, 교정 전 HD ciNSC는 교정 ciNSC에 비하여 분화 이전부터 높은 세포 사멸 유전자 발현을 나타내며 GABA성 신경세포로 분화 중에도 높은 발현을 유지하는 것을 확인하였다.

[116]

[117] **<실험예 6> 독성에 의한 헌팅턴병 유발 동물의 운동기능 회복 효과**

[118]

[119] SD 랫트에 헌팅턴병을 유발하기 위하여, 퀴놀릭산(Quinolinic acid, QA)을 1N NaOH에 녹인 후, 멸균된 0.1M PBS(pH7.4)에 200nmol/2ul로 용해하여 투여하였다. (AP: +0.8mm, ML: +2.8mm, DV: -5.5mm)

[120] 세포 이식 후 이종 면역 반응을 제거하기 위해 면역 억제제인 사이클로스포린 A를 PBS에 10mg/kg으로 희석하여 신경줄기세포 투여 이틀 전부터, 부검 전까지 매일 1회/일 복강 투여하고, 헌팅턴병 자가 피부세포-유래 유전자 교정 신경 줄기세포 (ciNSC)(실험군, G1) 및 부형제(대조군, G2) 를 각각 투여하였다. 뇌내 선조체 내에 직접 투여를 위해, stereotaxic 장비를 이용해, bregma를 기준으로 하여 ML:+2.2mm, AP:0.2mm, DV:-4.5mm 오른쪽 위치에 투여하였다. 상기 과정을 도 14에 도시하였다.

[121] 투여 후, 모든 군(G1~G2)에서 사망 또는 시험 물질 투여에 의한 행동학적 이상 증상은 관찰되지 않았다.

[122]

[123] **6-1. 로타로드 시험**

[124] 실험에 사용할 모든 동물은 QA 투여 전 8일간 훈련시켰으며, 이후에는 측정일 하루전에 훈련시켰다. 측정일에 실험동물을 로타로드의 회전봉 가운데 올려놓았다. 5분간 4~40rpm으로 로타로드를 가속 회전시키고, 회전이 시작된 시간부터 실험동물이 떨어질 때까지의 시간(sec)을 측정하였다. 총 3회를 측정한 값의 평균을 각 동물의 측정값으로 사용하였다. QA 투여 전, 시험물질 투여 전 및 후에 1회/1주 실시하였다.

[125] 로타로드 시험 측정 결과, 부형제 대조군 (G2)에 비해, 교정 신경줄기세포 투여군(G1)에서 1 내지 12주 동안 통계적으로 유의한 낙하시간 증가가 관찰되었다.

[126] **6-2. Balance beam 시험**

[127] 실험에 사용할 모든 동물은 QA 투여 전 5일간 훈련시켰으며, 이후에는 측정일 하루 전에 훈련시켰다. 측정일에 beam의 첫 부분에 실험동물을 올려놓았다. 높이 100cm, 길이120cm, 폭 5cm의 beam을 통과하는데 걸리는 시간을 측정하였다. QA 투여 전, 시험물질 투여 전 및 후에 1회/1주 실시하였다.

[128] Balance beam 시험 측정 결과, 부형제 대조군 (G2)에 비해, 교정 신경줄기세포 투여군(G1)에서 2 내지 12주 동안 통계적으로 유의한 Beam 통과 시간의 감소가 관찰되었다.

[129] **6-3. 아포모르핀 유도 회전 검사**

[130] 랫트에 아포모르핀을 1mg/kg을 피하투하 하였다. 이후 1시간동안 회전 챔버에서 회전하는 횟수를 측정하였다. QA 투여 전, 시험물질 투여 전 및 후에 1회/2주 실시하였다.

[131] 검사 결과, 부형제 대조군 (G2)에 비해, 교정 신경줄기세포 투여군(G1)에서 2 내지 12주 동안 통계적으로 유의한 회전수 감소가 관찰되었다.

[132] 상기 검토한 바와 같이, 독성에 의해 헌팅턴병을 유발한 동물 모델에서, 유전자 교정 신경줄기세포(ciNSC)를 뇌내 주입하였을 때, 운동능력이 회복되었음을 확인할 수 있었다. (도 15)

[133]

[134] **<실험예 7> 헌팅턴병 유전(R6/2) 동물의 운동기능 회복 효과**

[135] R6/2 mouse는 대표적인 급성 헌팅턴병 모델로써, 150회 이상의 돌연변이 CAG repeat을 가진 인간 mutant Htt의 exon1을 포함하는 헌팅턴병 형질 전환 모델이다. 투여를 위하여, 100mm dish에 헌팅턴병 자가 피부세포-유래 유전자 교정 신경 줄기세포 (ciNSC)를 대량 배양하였다. 투여 전에 일정량을 세포 배양 접시에서 분리하여, Trypan blue로 염색한 후, 광학 현미경과, 혈구 계수기 (hematocytometer)를 이용하여 생존 세포를 계수하며, 생존율과 생존 세포 농도를 계수하였다. 세포 계수 후 생존 세포 농도가 기준범위 (기존농도 ±10%)를 벗어나면 생존 세포수를 보정한 후, 투여 농도에 맞게 부형제로 희석하였다.

[136] 세포 이식 후, 이종 면역 반응 억제를 위해, 면역억제제인 사이클로스포린 A를 PBS에 10mg/kg으로 희석하여 시험물질 투여 이틀 전부터, 부검 전까지 매일

1회/일 복강 투여하였다. 이후, 헌팅턴병 자가 피부세포-유래 유전자 교정 신경 줄기세포 (ciNSC)(실험군, G2) 및 부형제(대조군, G3)를 각각 투여하였다. 뇌내 선조체 내에 직접 투여를 위해, stereotaxic 장비를 이용해, bregma를 기준으로 하여 ML:±2.0mm, AP:0.0mm, DV:-3.25mm 위치에 양쪽 투여하였다 상기 과정을 도 16에 도시하였다.

[137] 모든 동물에서 교정 신경줄기세포 투여에 의한 행동학적 이상 증상은 관찰되지 않았다.

[138] **7-1. 로타로드 시험**

[139] 상기 6-1과 동일한 방법으로, 1회/1주 시험을 실시하였다. 그 결과, 부형제 투여군(G3)에 비해, 교정 신경줄기세포 투여군(G2)에서 1주 내지 3주 까지 통계적으로 유의한 낙하시간 증가가 관찰되었다(도 17).

[140] **7-2. Grip strength 시험**

[141] 상기 각 실험군에 대하여, Grip strength 시험을 진행하였으며, 각 실험군의 마우스가 grip을 잡은 후, 앞발이 떨어질 때의 악력을 1회/1주 측정하였다. 그 결과, 부형제 투여군(G3)에 비해, 교정 신경줄기세포 투여군(G2)에서 1 내지 4주까지 통계적으로 유의한 악력의 증가가 관찰되었다(도 17).

[142] **7-3. 체중 및 생존 측정**

[143] 모든 동물은 입고 날짜부터 3일 간격으로 몸무게를 측정하였다. 또한, 모든 동물의 사망 날짜를 기록하였다.

[144] 그 결과, 도 18과 같이, 약 80이후, 부형제 투여군의 생존률이 감소하기 시작하였으나, 교정 신경줄기세포 투여군(G2)에서는 이보다 긴 생존기간을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 체중 변화에 있어서, 생후 80일 이후 부터는 부형제 투여군(G3)에 비해, 교정 신경줄기세포 투여군(G2)의 체중 감소가 줄어드는 것을 확인하였다.

[145] **7-4. 유전자 교정에 따른 유효성 검증**

[146] 헌팅턴병 환자 유래 신경줄기세포에서 유전자교정 전과 후의 유효성을 검증하기 위하여, 상기 R6/2 mouse 모델을 이용하여, 상기와 동일한 과정으로, 교정 전 헌팅턴병 자가 체세포-유래 신경 줄기세포(교정전 HD ciNSC, G1) 및 교정 신경 줄기세포 (교정 ciNSC, G2)를 각각 투여하고, 운동 능력 상실 및 유지와 관련된 실험을 진행하였다.

[147] 그 결과, 도 19에서 보듯이, Grip strength 시험 및 로타로드 시험 결과, 교정 신경 줄기세포 (교정 ciNSC, G2) 투여군이 G1에 비해 운동 능력 상실 회복 정도가 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 케이지로 하강하기 위해 기둥을 잡고 기동하는 마우스의 능력을 평가하며, 마우스는 기둥 상단에 머리가 위쪽으로 향하도록 올려놓았고, 홈 케이지로 내려오는 시간을 측정하는 폴(Pole) 테스트 결과에서도, G2 투여군에서 상기와 같은 운동 능력의 회복을 확인할 수 있었다.

[148] 또한, 신경줄기세포 투여군에서 투여 부위 주변 뇌조직을 이용한 Immunohistochemistry에서 인간 특이적 마커(Human Nuclear, Human

Mitochondria) 및 신경세포 마커를 이용한 염색을 통해, 뇌내에 이식된 신경줄기세포가 생존함을 확인하였다. (도 20)

[149] 상기 결과로부터, 돌연변이 헌팅틴 유전자의 교정이 유효함을 확인할 수 있었다.

[150] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[151] 일 양태로서, 본 발명은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 헌팅틴(HTT) 유전자 교정용 조성물에 대한 것이다.

[152] 일 실시예로서, 상기 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)은 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것이다.

[153] 일 실시예로서, 상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 상기 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 내 포함되는 5'-Nx-NGG-3' 또는 5'-PAM(CCN)-Nx-3'의 서열을 포함하는 것으로, 상기 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, Nx에서 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, x는 20 이내의 숫자이다.

[154] 일 실시예로서, 상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[155] 일 실시예로서, 상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자이다.

[156] 일 실시예에서, 상기 Cas 단백질은 Cas9이다.

[157] 다른 양태로서, 본 발명은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5'비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)에 형질 도입하는 단계를 포함하는 헌팅틴 유전자의 교정 방법에 대한 것이다.

[158] 일 실시예로서, 상기 형질 도입은 미세주입법 (microinjection), 전기천공법 (electroporation), DEAE-덱스트란 처리 (DEAE-dextran treatment), 리포펙션 (lipofection), 나노파티클-매개 형질주입, 단백질 전달 도메인 매개 도입,

바이러스 또는 비바이러스 매개 유전자 전달체 및 엑소좀 중 선택되는 어느 하나의 방법을 사용하는 것일 수 있다.

[159] 일 실시예로서, 상기 바이러스 또는 비바이러스 매개 유전자 전달체는 바이러스 벡터 또는 플라스미드일 수 있다.

[160] 일 실시예로서, 상기 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)는 헌팅턴병 환자의 체세포로부터 직접 교차 분화로 유도된 것일 수 있다.

[161] 일 실시예에서 상기 직접 교차 분화는 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, DZNep(Deazaneplanocin A), 5-AZA 및 CHIR99021 중 하나 이상을 조합하여 포함하는 배지에서 헌팅턴병 환자의 체세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[162] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기의 조성물에 의해 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)를 포함하는 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대한 것이다.

[163] 일 실시예로서, 상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)는 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)의 5'비번역부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 포함되는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열이 교정된 것일 수 있다.

[164] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)에 형질 도입하여 헌팅틴 유전자를 교정하는 단계를 포함하는 헌팅턴병의 예방 또는 치료 방법에 대한 것이다.

[165] 일 실시예로서, 상기 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)는 헌팅턴병 환자의 체세포로부터 직접 교차 분화로 유도된 것이다.

[166] 일 실시예로서, 상기 직접 교차 분화는 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익산(Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, DZNep(Deazaneplanocin A), 5-AZA 및 CHIR99021 중 하나 이상을 조합하여 포함하는 배지에서 헌팅턴병 환자의 체세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[167] 일 실시예로서, 상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)는 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)의 5'비번역부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 포함되는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열이 교정된 것일 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA, 또는 상기 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및
Cas단백질 또는 이를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 헌팅틴(HTT) 유전자 교정용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)은 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인 헌팅틴(HTT) 유전자 교정용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 상기 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열 내 포함되는 5’-Nx-NGG-3’ 또는 5’-PAM(CCN)-Nx-3’의 서열을 포함하는 것으로, 상기 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, Nx에서 N은 각각 A, G, C 및 T 중 임의의 하나이고, x는 20 이내의 숫자인 헌팅틴(HTT) 유전자 교정용 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 헌팅틴(HTT) 유전자 교정용 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 가이드 RNA의 타겟 서열은 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자인 헌팅틴(HTT) 유전자 교정용 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 Cas 단백질은 Cas9인 헌팅틴(HTT) 유전자 교정용 조성물.

[청구항 7] 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및
Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)에 형질 도입하는 단계를 포함하는 헌팅틴 유전자의 교정 방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 형질 도입은 미세주입법 (microinjection), 전기천공법 (electroporation), DEAE-덱스트란 처리 (DEAE-dextran treatment), 리포펙션 (lipofection), 나노파티클-매개 형질주입, 단백질 전달 도메인 매개 도입, 바이러스 또는 비바이러스 매개 유전자 전달체 및 엑소좀 중 선택되는 어느 하나의 방법으로 형질 도입되는 것인, 헌팅틴 유전자의 교정 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서,

상기 바이러스 또는 비바이러스 매개 유전자 전달체는 바이러스 벡터 또는 플라스미드인, 헌팅틴 유전자의 교정 방법.

[청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)는 헌팅턴병 환자의 체세포로부터 직접 교차 분화로 유도된 것인 헌팅틴 유전자의 교정 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 직접 교차 분화는 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익산 (Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, DZNep(Deazaneplanocin A), 5-AZA 및 CHIR99021 중 하나 이상을 조합하여 포함하는 배지에서 헌팅턴병 환자의 체세포를 배양하는 단계를 포함하는 것인 헌팅틴 유전자의 교정 방법.

[청구항 12] 제1항의 조성물에 의해 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)를 포함하는 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)는 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)의 5'비번역부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 포함되는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열이 교정된 것인 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[청구항 14] 헌팅틴(HTT) 유전자의 5‘비번역 부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA를 암호화하는 DNA; 및 Cas 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)에 형질 도입하여 헌팅틴 유전자를 교정하는 단계를 포함하는 헌팅턴병의 예방 또는 치료 방법.

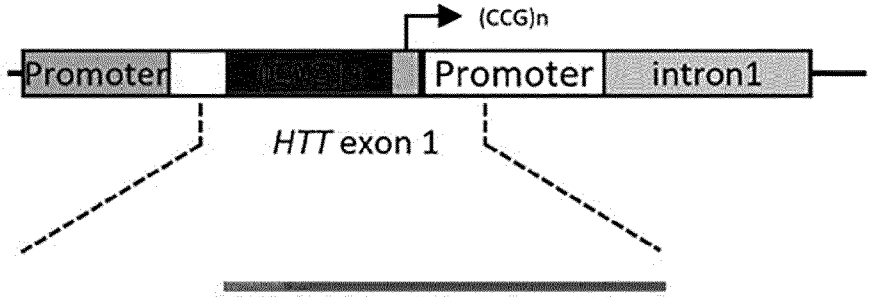
[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)는 헌팅턴병 환자의 체세포로부터 직접 교차 분화로 유도된 것인 헌팅턴병의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 직접 교차 분화는 티아조비빈(Thiazovivin), 발프로익산 (Valproic acid), 퍼모파민(Purmorphamine), A8301, SB431542, DZNep(Deazaneplanocin A), 5-AZA 및 CHIR99021 중 하나 이상을 조합하여 포함하는 배지에서 헌팅턴병 환자의 체세포를 배양하는 단계를 포함하는 것인, 헌팅턴병의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 17] 제14항에 있어서,

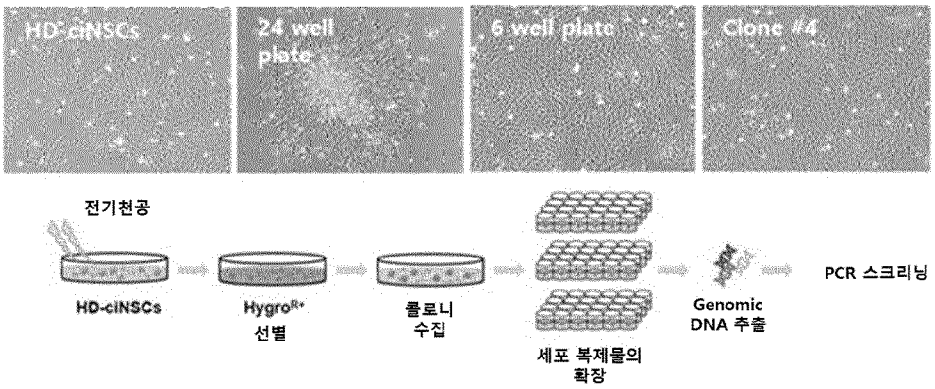
상기 교정된 유도신경줄기세포(ciNSC)는 비정상적인 CAG 반복 서열을 포함하는 돌연변이된 헌팅틴(HTT) 유전자를 포함하고 있는 유도신경줄기세포(HD-ciNSC)의 5'비번역부위(UTR) 및 제1엑손(exon)에 포함되는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열이 교정된 것인, 헌팅턴병의 예방 또는 치료 방법.

[도1]

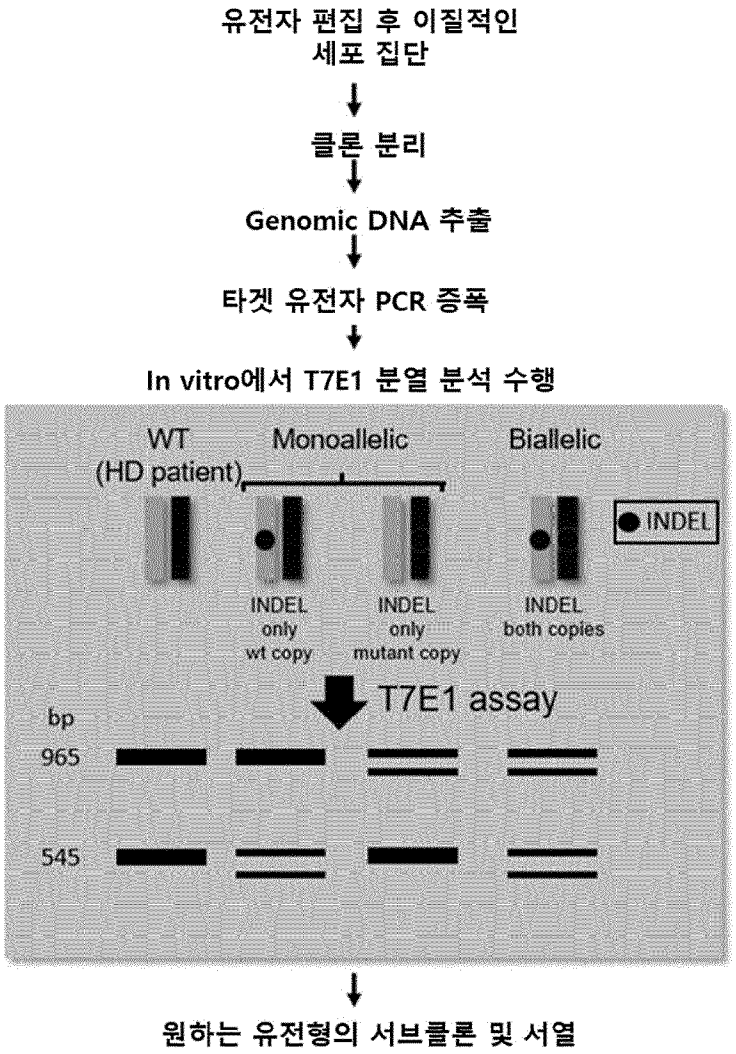


GGCCTCCGGGGACTGCCGTGCCGGGCGGGAGACCGCCATGGCGACCCTGGAAA
CCGGAGGCCCCTGACGGCACGGCCCGCCCTCTGGCGGTACCGCTGGGACCTTT

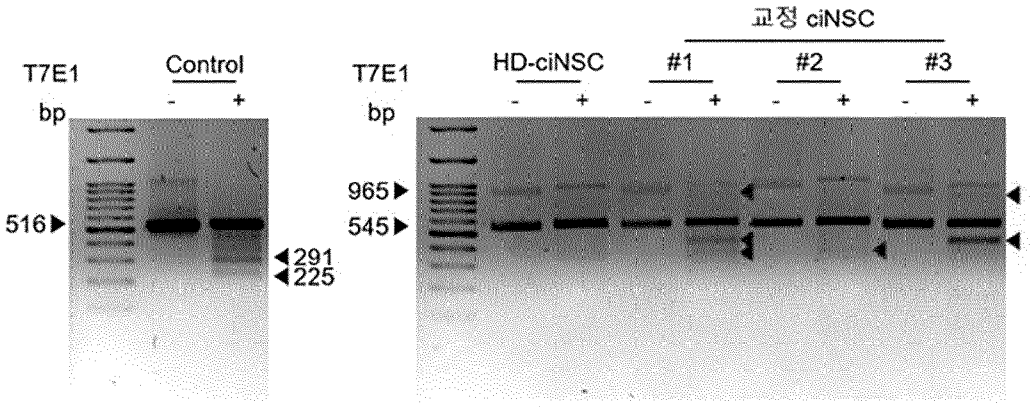
[도2]



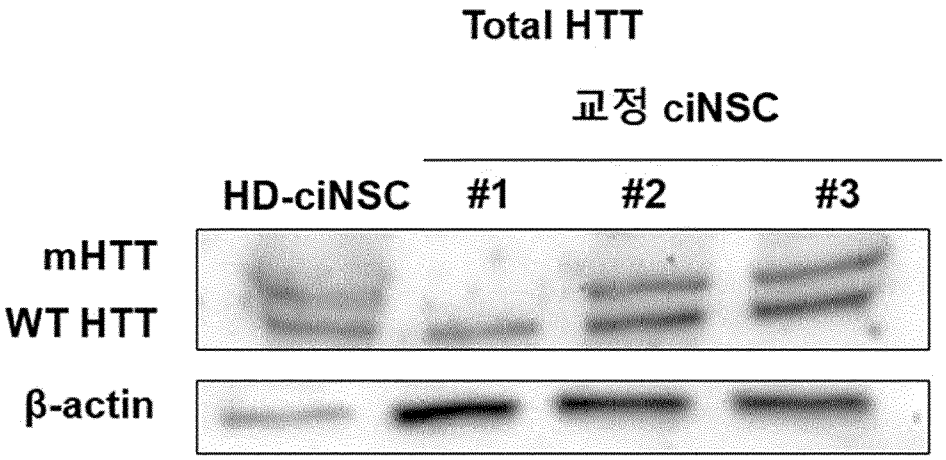
[도3]


유전자 편집 후 이질적인
세포 집단
클론 분리
Genomic DNA 추출
타겟 유전자 PCR 증폭
In vitro에서 T7E1 분열 분석 수행
WT
(HD patient)
Monoallelic
Biallelic
INDEL
INDEL
only
wt copy
INDEL
only
mutant copy
INDEL
both copies
T7E1 assay
bp
965
545
원하는 유전형의 서브클론 및 서열

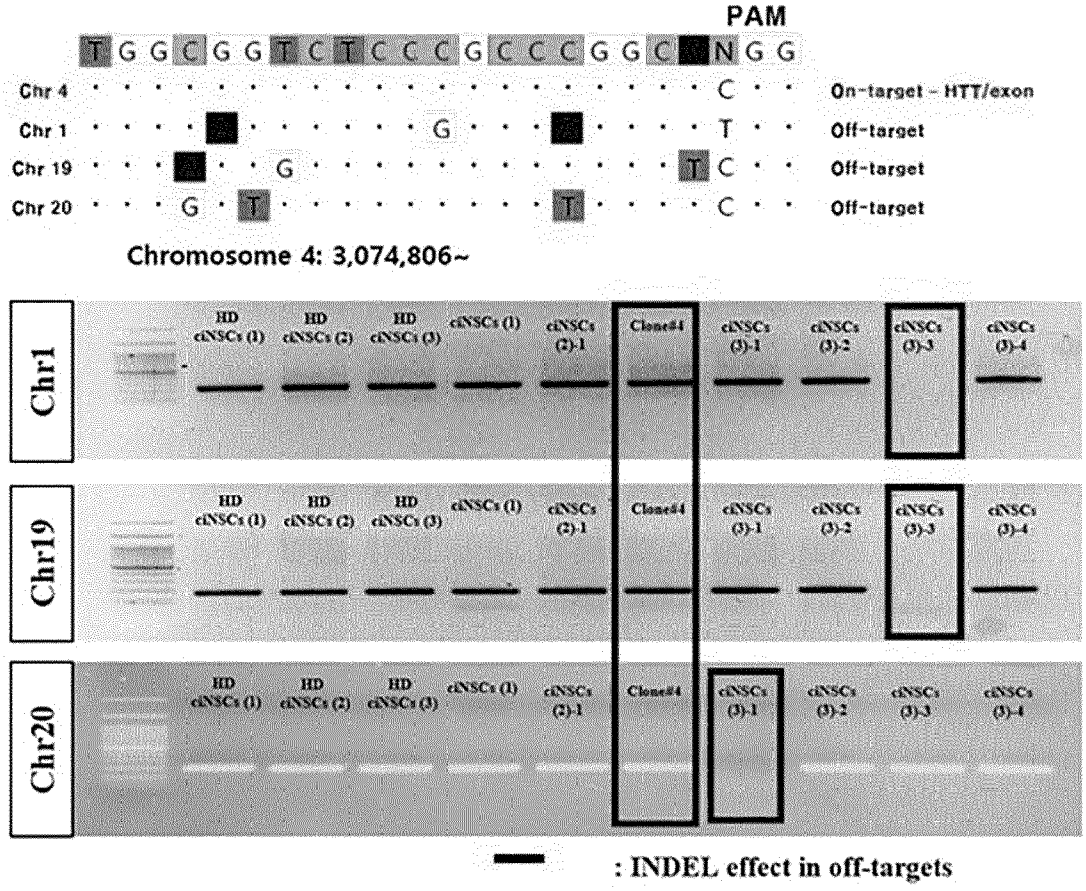
[도4]


교정 ciNSC
T7E1
Control
bp
- +
516
291
225
T7E1
HD-ciNSC
#1
#2
#3
bp
- + - + - + - +
965
545

[도5]


Total HTT
교정 ciNSC
HD-ciNSC
#1
#2
#3
mHTT
WT HTT
β-actin

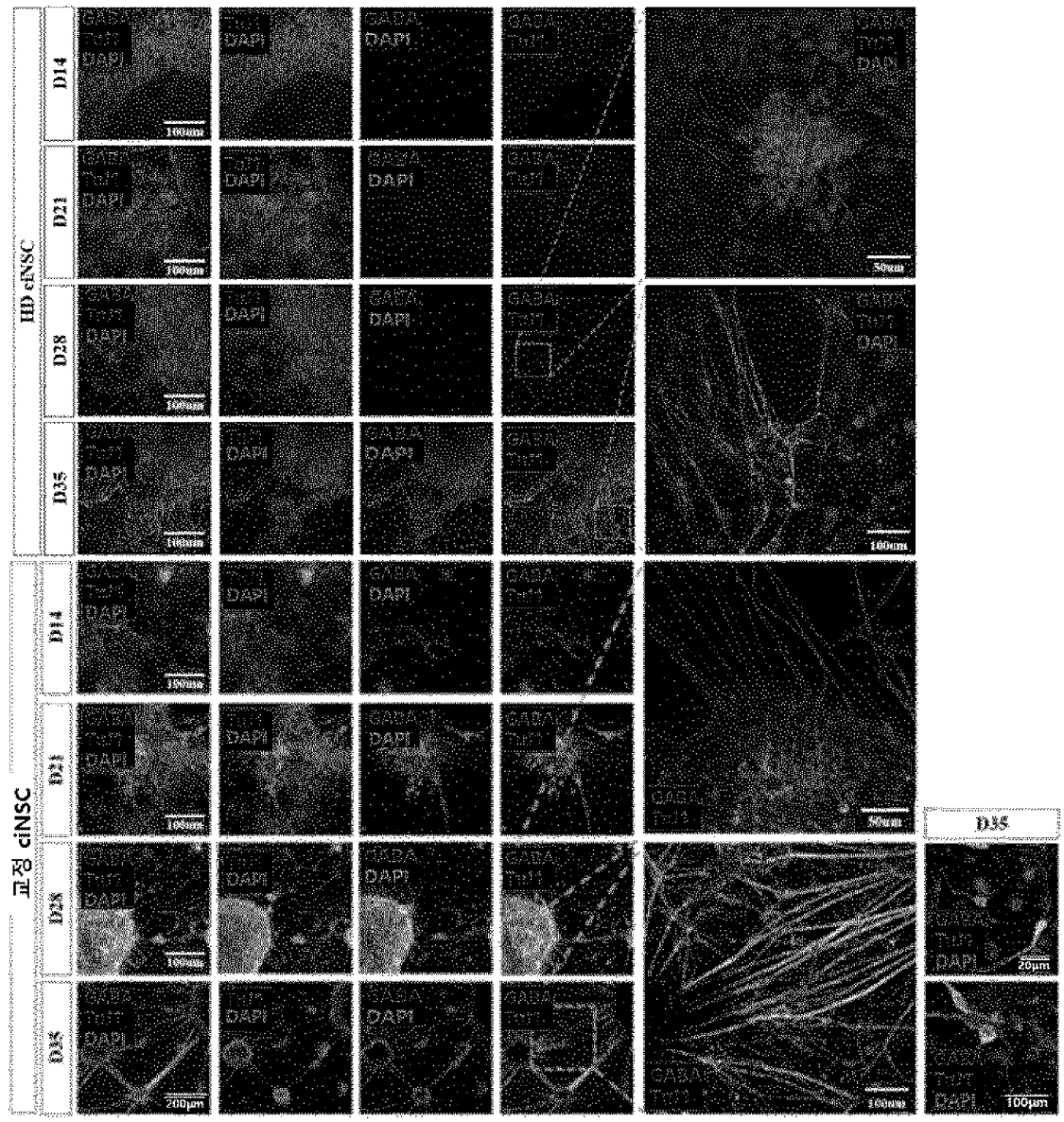
[도6]


PAM
T G G C G G T C T C C C G C C C G G C N G G
Chr 4 On-target – HTT/exon
Chr 1 Off-target
Chr 19 Off-target
Chr 20 Off-target
Chromosome 4: 3,074,806~
Chr1
Chr19
Chr20
HD ciNSCs (1)
HD ciNSCs (2)
HD ciNSCs (3)
ciNSCs (1)
ciNSCs (2)-1
Clone#4
ciNSCs (3)-1
ciNSCs (3)-2
ciNSCs (3)-3
ciNSCs (3)-4
: INDEL effect in off-targets

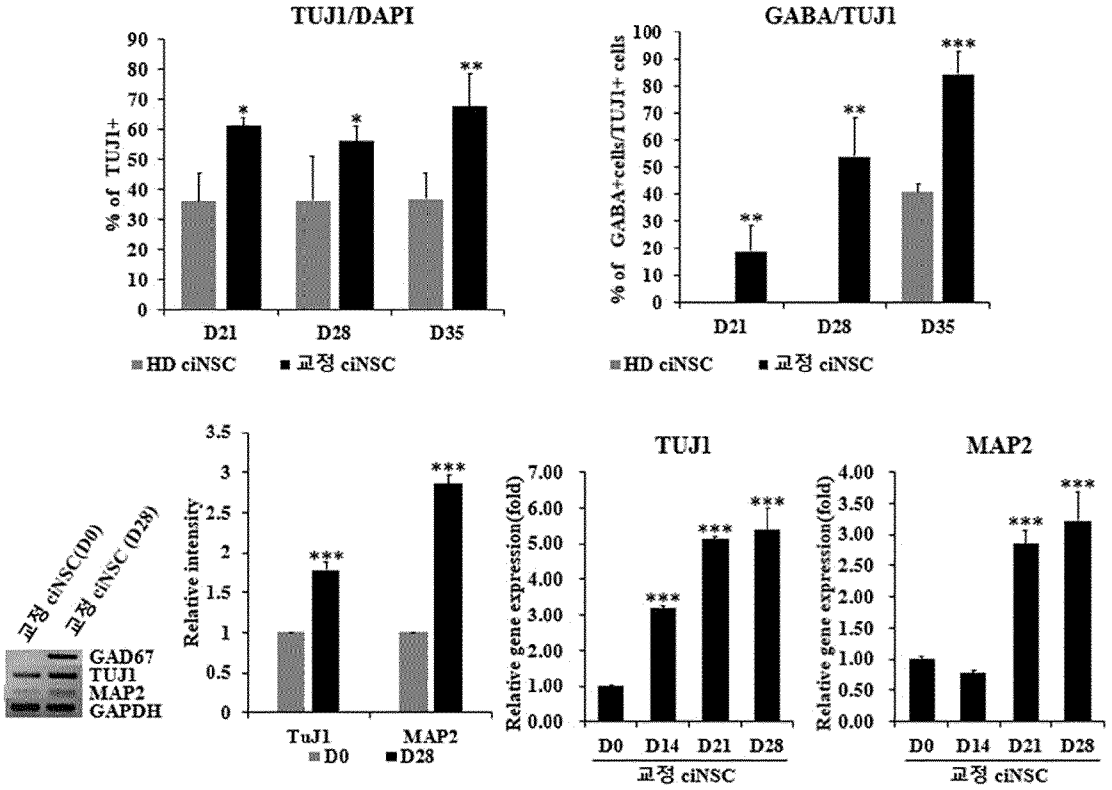
WO 2024/219882 PCT/KR2024/005314

규칙 91,
26.06.2024

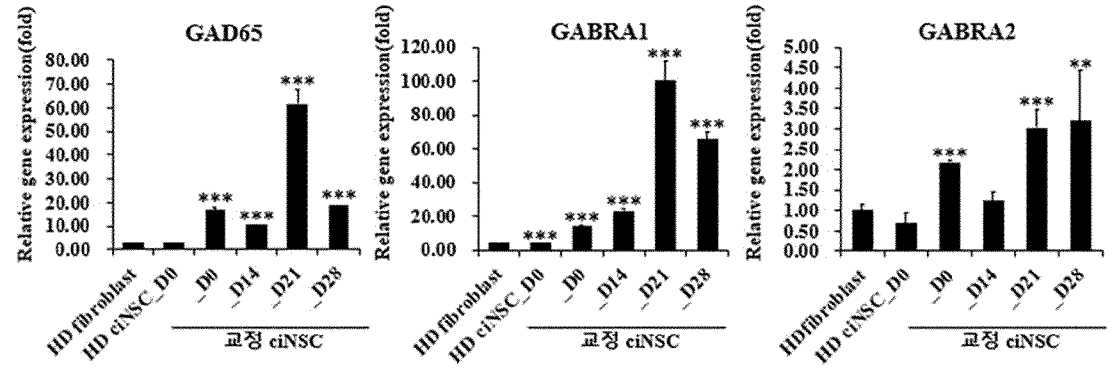
[도7]



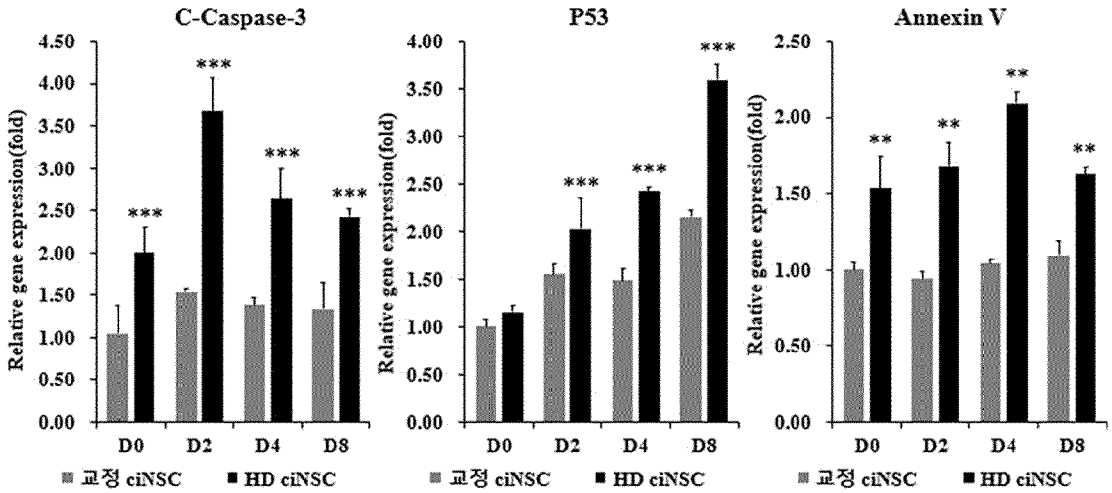
[도8]


TUJ1/DAPI
% of TUJ1+
D21
D28
D35
HD ciNSC
교정 ciNSC
GABA/TUJ1
% of GABA+cells/TUJ1+ cells
교정 ciNSC(D0)
교정 ciNSC (D28)
GAD67
TUJ1
MAP2
GAPDH
Relative intensity
TuJ1
MAP2
D0
D28
TUJ1
MAP2
Relative gene expression(fold)
D0
D14
D21
D28
교정 ciNSC

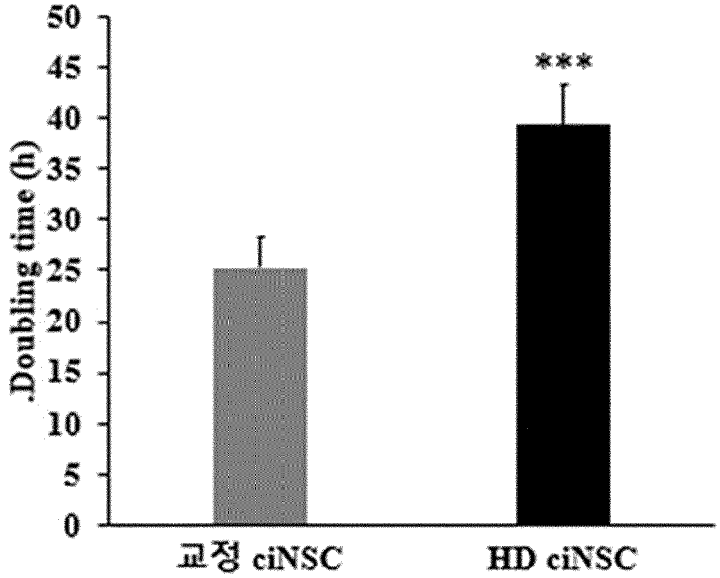
[도9]


GAD65
GABRA1
GABRA2
Relative gene expression(fold)
HD fibroblast
HD ciNSC_D0
_D0
_D14
_D21
_D28
교정 ciNSC

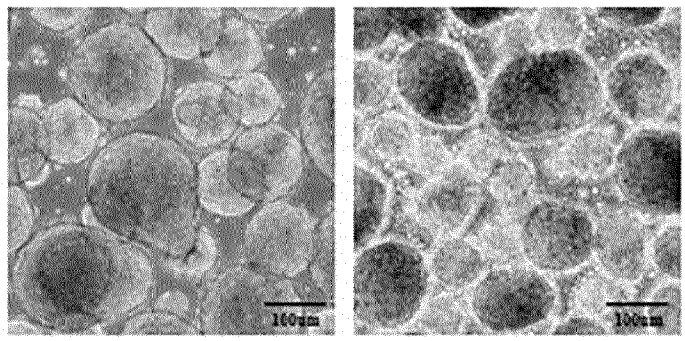
[도10]


C-Caspase-3
P53
Annexin V
Relative gene expression(fold)
D0
D2
D4
D8
교정 ciNSC
HD ciNSC

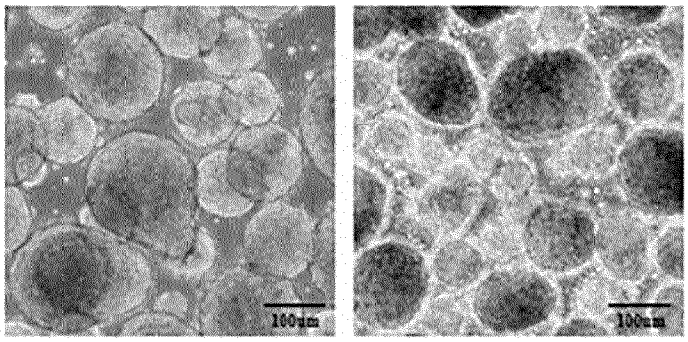
[도11]


50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
Doubling time (h)
***
교정 ciNSC
HD ciNSC

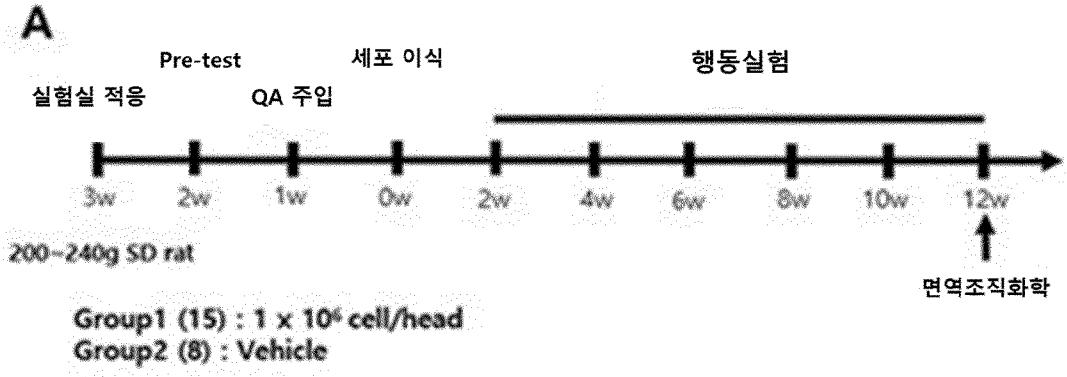
[도12]


100㎛
100㎛
교정 ciNSC(D4)
HD ciNSC

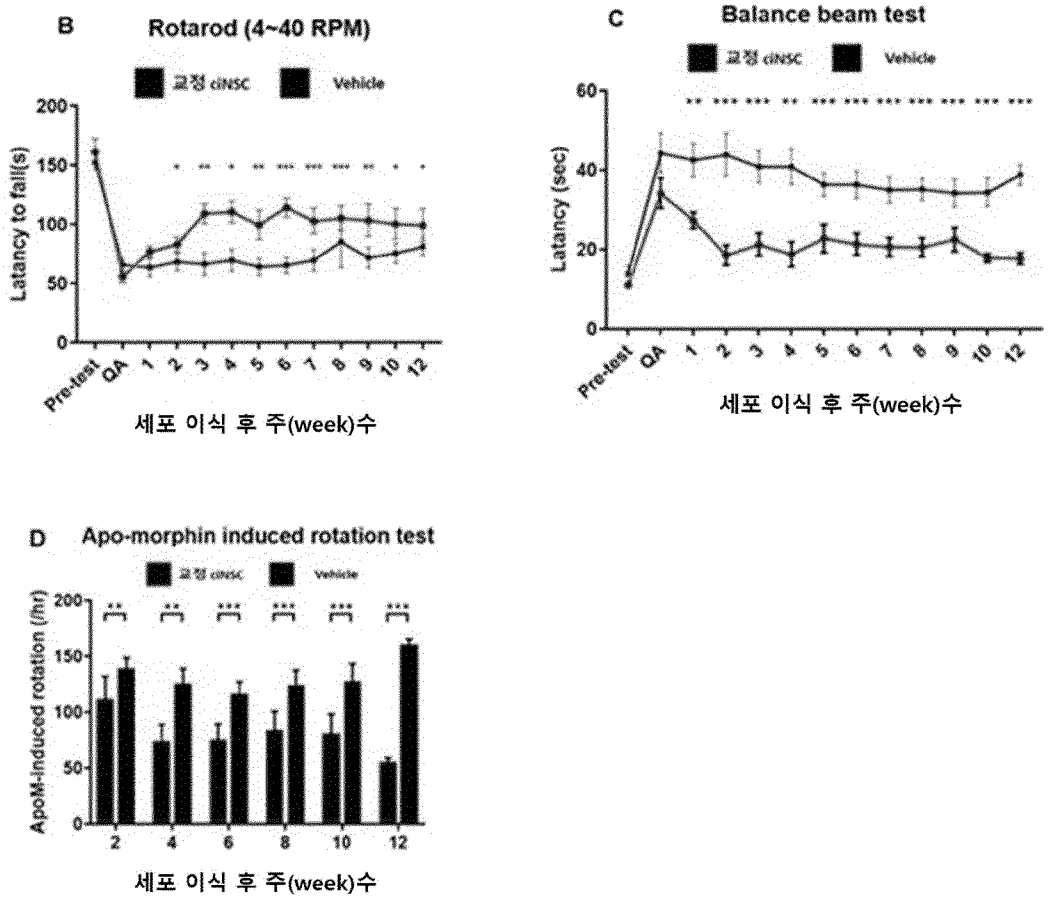
[도13]


100㎛
100㎛
교정 ciNSC(D4)
HD ciNSC

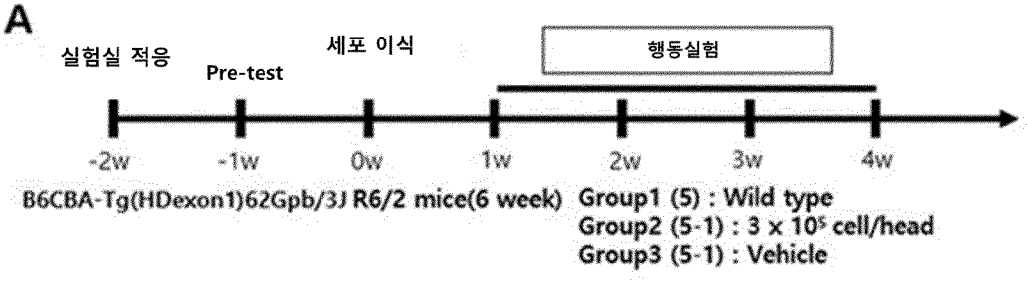
[도14]


A
Pre-test
세포 이식
행동실험
실험실 적응
QA 주입
3w
2w
1w
0w
2w
4w
6w
8w
10w
12w
200~240g SD rat
면역조직화학
Group1 (15) : 1 x 10⁶ cell/head
Group2 (8) : Vehicle

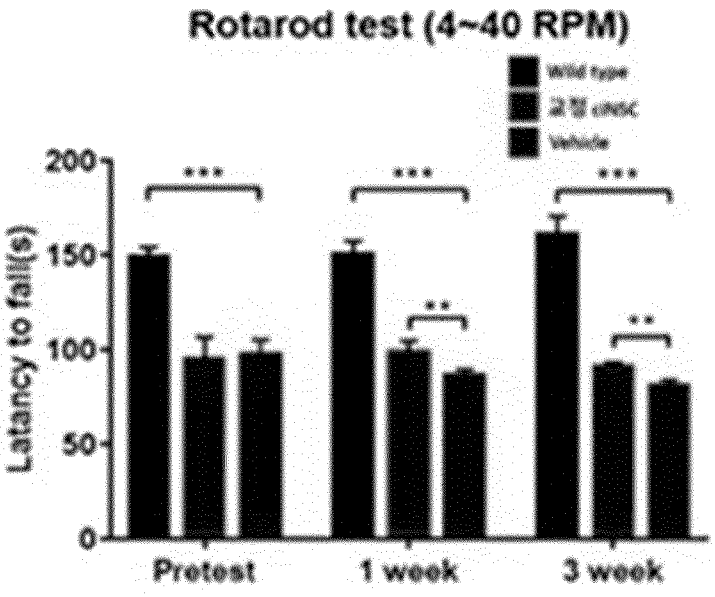
[도15]

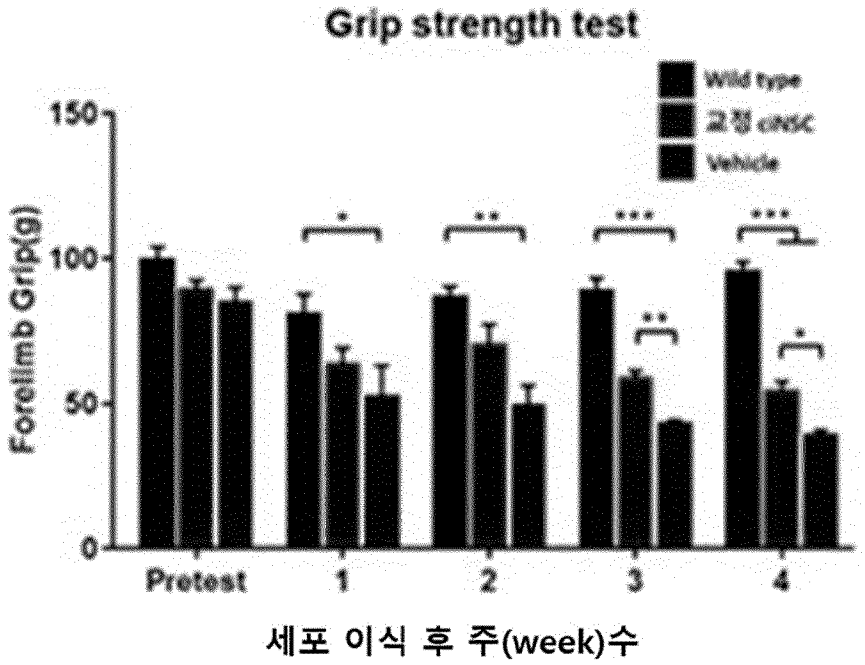

B
Rotarod (4~40 RPM)
교정 ciNSC
Vehicle
Latancy to fall(s)
세포 이식 후 주(week)수
C
Balance beam test
교정 ciNSC
Vehicle
Latancy (sec)
세포 이식 후 주(week)수
D
Apo-morphin induced rotation test
교정 ciNSC
Vehicle
ApoM-induced rotation (/hr)
세포 이식 후 주(week)수

[도16]

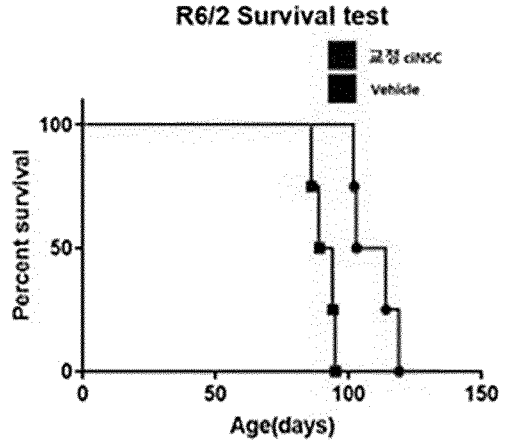

A
실험실 적응
Pre-test
세포 이식
행동실험
-2w
-1w
0w
1w
2w
3w
4w
B6CBA-Tg(HDexon1)62Gpb/3J R6/2 mice(6 week)
Group1 (5) : Wild type
Group2 (5-1) : 3 x 10⁵ cell/head
Group3 (5-1) : Vehicle

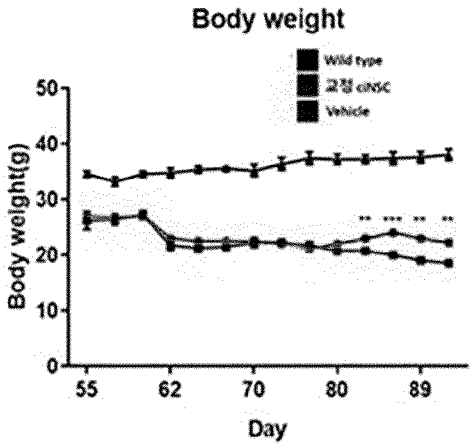
[도17]


Rotarod test (4~40 RPM)
Wild type
교정 ciNSC
Vehicle
Latancy to fall(s)
200
150
100
50
0
***
***
***
**
**
Pretest
1 week
3 week
세포 이식 후 주(week)수

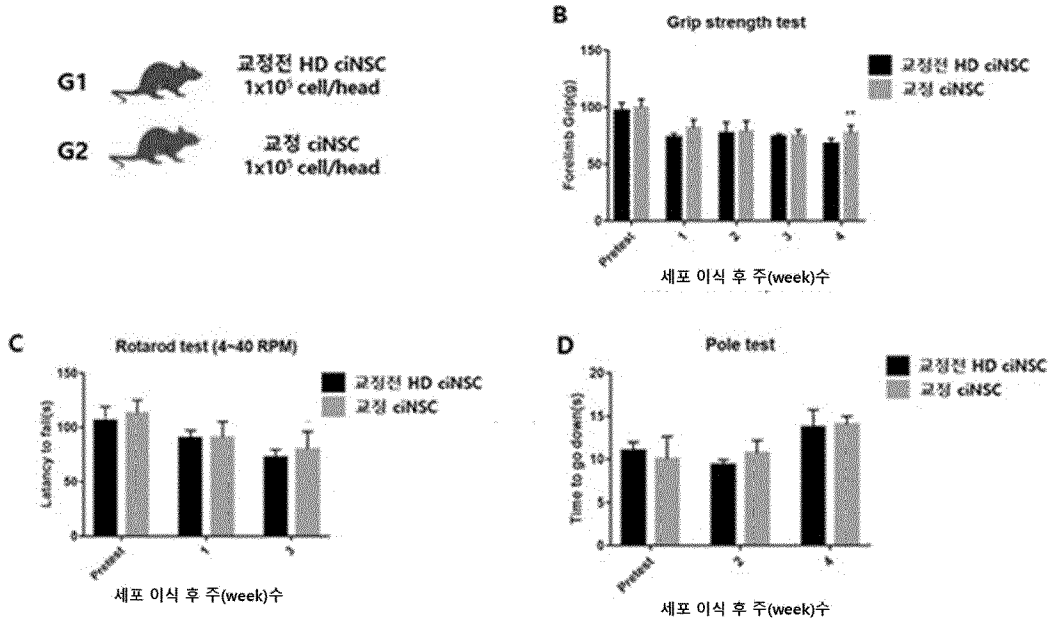

Grip strength test
Wild type
교정 ciNSC
Vehicle
Forelimb Grip(g)
150
100
50
0
*
**
***
***
**
*
Pretest
1
2
3
4
세포 이식 후 주(week)수

[도18]

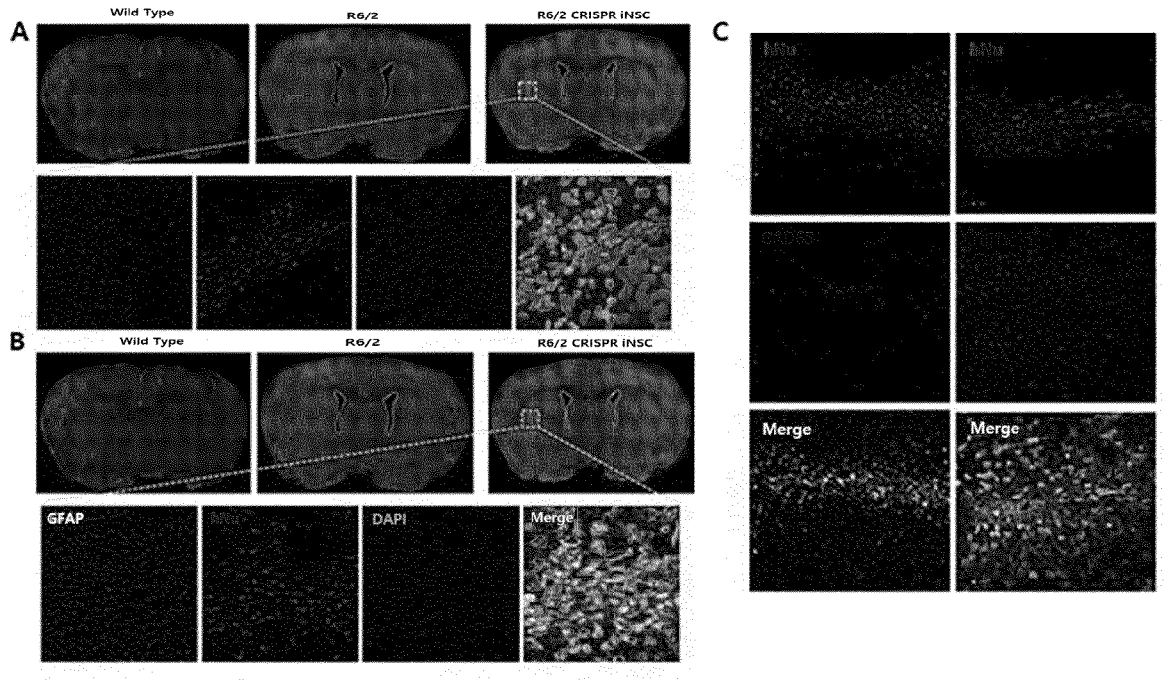

R6/2 Survival test
교정 ciNSC
Vehicle
Percent survival
100
50
0
0
50
100
150
Age(days)


Body weight
Wild type
교정 ciNSC
Vehicle
Body weight(g)
50
40
30
20
10
0
55
62
70
80
89
Day

[도19]



[도20]



규칙 91,
26.06.2024

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/005314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/113(2010.01)i; **C12N 9/22**(2006.01)i; **C12N 15/10**(2006.01)i; **C12N 15/85**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61K 35/30**(2006.01)i; **A61P 25/14**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/113(2010.01); A61K 35/30(2006.01); A61K 38/17(2006.01); A61K 38/18(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 헌팅틴(huntingtin), 헌팅턴병(huntington disease), 가이드 RNA(guide RNA, gRNA), 엑손(exon), 비번역 부위(untranslated region), Cas9, 유전자 교정(gene editing), CAG 반복(CAG repeat), 유도신경줄기세포(induced neural stem cell, iNSC), 직접 교차분화(direct reprogramming)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	DABROWSKA, Magdalena et al. Precise excision of the CAG tract from the huntingtin gene by Cas9 nickases. Frontiers in Neuroscience. 26 February 2018 (publication date), vol. 12, article no. 75, inner pp. 1-8.	
X	See abstract; inner pages 2-5; and figure 1.	1,2,5,6
Y		7-12
A		3,4,13
	SON, Jiyeon. Correction and verification of mutant huntingtin gene by CRISPR-Cas9 system in neural stem cells. 고려대학교 일반대학원 석사학위논문 (Master's thesis, Graduate School, Korea University). 2021, pp. I-VII and 1-49.	
Y	See pages 48 and 49.	7-12
	KR 10-2016-0122078 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 21 October 2016 (2016-10-21)	
Y	See paragraphs [0001], [0008], [0009], [0037] and [0038].	11

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 August 2024	**13 August 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EKMAN, Freja K. et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing increases lifespan and improves motor deficits in a huntington`s disease mouse model. Molecular Therapy: Nucleic Acids. 2019, vol. 17, pp. 829-839. See abstract; pages 830-832; and figures 1 and 2.	1,2,5,6
A	KR 10-2017-0005811 A (SANGAMO BIOSCIENCES, INC. et al.) 16 January 2017 (2017-01-16) See abstract; and claims 1-16.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/005314

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2024/005314

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **14-17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 14-17 pertain to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/005314

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2016-0122078 A	21 October 2016	CN 107454913 A	08 December 2017
		CN 107454913 B	10 July 2020
		JP 2018-516064 A	21 June 2018
		JP 6599468 B2	30 October 2019
		KR 10-1816103 B1	08 January 2018
		US 10711245 B2	14 July 2020
		US 2018-0010094 A1	11 January 2018
		WO 2016-167528 A1	20 October 2016
KR 10-2017-0005811 A	16 January 2017	AU 2015-255877 A1	12 November 2015
		AU 2015-255877 B2	26 March 2020
		CA 2947035 A1	12 November 2015
		CN 106413760 A	15 February 2017
		CN 106413760 B	14 January 2020
		EP 3139966 A1	15 March 2017
		EP 3139966 B1	18 November 2020
		JP 2017-515819 A	15 June 2017
		KR 10-2380324 B1	30 March 2022
		US 11110154 B2	07 September 2021
		US 2015-0335708 A1	26 November 2015
		WO 2015-171932 A1	12 November 2015

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/005314

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/113(2010.01)i; **C12N 9/22**(2006.01)i; **C12N 15/10**(2006.01)i; **C12N 15/85**(2006.01)i; **A61K 48/00**(2006.01)i; **A61K 35/30**(2006.01)i; **A61P 25/14**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/113(2010.01); A61K 35/30(2006.01); A61K 38/17(2006.01); A61K 38/18(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 헌팅틴(huntingtin), 헌틴턴병(huntington disease), 가이드 RNA(guide RNA, gRNA), 엑손(exon), 비번역 부위(untranslated region), Cas9, 유전자 교정(gene editing), CAG 반복(CAG repeat), 유도신경줄기세포(induced neural stem cell, iNSC), 직접 교차분화(direct reprogramming)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y A	DABROWSKA, MAGDALENA 등, "Precise excision of the CAG tract from the huntingtin gene by Cas9 nickases", Frontiers in Neuroscience, 2018년 2월 26일(공개일), 12권, 기사번호 75, 내부페이지 1-8 요약; 내부페이지 2-5; 및 도면 1	1,2,5,6 7-12 3,4,13
Y	손지연, "Correction and verification of mutant huntingtin gene by CRISPR-Cas9 system in neural stem cells", 고려대학교 일반대학원 석사학위논문, 2021년, 페이지 I-VII 및 1-49 페이지 48, 49	7-12
Y	KR 10-2016-0122078 A (고려대학교 산학협력단) 2016.10.21 단락 [0001], [0008], [0009], [0037], [0038]	11
X	EKMAN, FREJA K. 등, "CRISPR-Cas9-mediated genome editing increases lifespan and improves motor deficits in a huntington`s disease mouse model", Molecular Therapy: Nucleic Acids, 2019년, 17권, 페이지 829-839 요약; 페이지 830-832; 및 도면 1, 2	1,2,5,6

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년08월12일(12.08.2024)	**2024년08월13일(13.08.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/005314

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2017-0005811 A (상가모 바이오사이언스 인코포레이티드 등) 2017.01.16 요약; 및 청구항 1-16	1-13

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/005314

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2024/005314

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **14-17**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 14-17은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2024/005314

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0122078 A	2016/10/21	CN 107454913 A	2017/12/08
		CN 107454913 B	2020/07/10
		JP 2018-516064 A	2018/06/21
		JP 6599468 B2	2019/10/30
		KR 10-1816103 B1	2018/01/08
		US 10711245 B2	2020/07/14
		US 2018-0010094 A1	2018/01/11
		WO 2016-167528 A1	2016/10/20
KR 10-2017-0005811 A	2017/01/16	AU 2015-255877 A1	2015/11/12
		AU 2015-255877 B2	2020/03/26
		CA 2947035 A1	2015/11/12
		CN 106413760 A	2017/02/15
		CN 106413760 B	2020/01/14
		EP 3139966 A1	2017/03/15
		EP 3139966 B1	2020/11/18
		JP 2017-515819 A	2017/06/15
		KR 10-2380324 B1	2022/03/30
		US 11110154 B2	2021/09/07
		US 2015-0335708 A1	2015/11/26
		WO 2015-171932 A1	2015/11/12